
学位論文

細菌由来因子に対する培養歯髄線維芽細胞の動態と 緑茶カテキンの抗炎症作用

向井 佳代

キーワード：歯髄炎，カテキン，TLR

Anti-inflammatory Effect of Green Tea Catechin on Cultured Dental Pulp Fibroblasts Affected by Bacteria-derived Factors

Kayo MUKAI

Abstract : Pulpitis mainly results from the invasion of dental caries-related bacteria into dental pulp. It is known that various proinflammatory cytokines and adhesion molecules play important roles in the exacerbation of pulpitis but detail expression mechanisms are not fully elucidated. Recently, green tea catechins have been reported to exhibit anti-inflammatory properties; however, it is unclear whether the catechins have anti-inflammatory effects on inflamed dental pulp tissue. The purpose of this study is to determine the effect of bacteria-derived factors on cultured dental pulp fibroblasts and to clarify the anti-inflammatory potential of catechin. We used epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and epicatechin gallate (ECG), the major components of green tea catechins. The expressions of proinflammatory cytokines and adhesion molecules were examined in cultured human pulp fibroblasts treated with bacteria-derived factors, *i.e.*, lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN). The expressions of interleukin-8 (IL-8) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in pulp fibroblasts exposed to LPS or PGN were examined by RT-PCR, and by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In addition, adhesion molecule (ICAM-1 and VCAM-1) expression on pulp fibroblasts was analyzed by flow cytometry. Both LPS and PGN increased not only IL-8 and VEGF expressions but also ICAM-1 and VCAM-1 expressions in pulp fibroblasts. When pulp fibroblasts pre-treated with EGCG or ECG were exposed to LPS or PGN, EGCG and ECG treatment significantly reduced IL-8, IL-6 and VEGF levels in a dose-dependent manner. ICAM-1 and VCAM-1 expressions on pulp fibroblasts were also decreased by EGCG and ECG treatment. Catechins themselves were not cytotoxic to pulp fibroblasts. When catechins were applied after treatment with LPS or PGN, the result showed an anti-inflammatory effect similarly to pre-treatment with catechin. By treatments of EGCG and ECG, mRNA expressions of DSP and DSPP, involved in tooth formation and mineralization, decreased in pulp fibroblasts. These findings suggest that green tea catechins may have sedative action against pulpitis and show the possibility of clinical application.

緒 言

歯髄は硬組織である象牙質に囲まれ、細胞成分として、象牙芽細胞、線維芽細胞、未分化間葉細胞、樹状細胞やマクロファージなどの免疫担当細胞が存在している。周囲の組織とは根尖孔で交通する特殊な環境の中にあるため、生体の防御反応や組織の修復機転が起こりにくく、炎症のコントロールが重要であると考えられている^{1,3)}。歯髄炎のほとんどは、齶蝕の進行により象牙質深部に侵入した細菌や、その細菌が産生する成分が象牙細管を通じて抗原刺激となり、象牙芽細胞近傍に分布している樹状細胞やマクロファージといった免疫担当細胞を活性化することにより発症すると考えられている。これらの細胞により免疫応答が惹起された歯髄では、リンパ球の浸潤が起こり、炎症が進展していくと考えられている^{4,5)}。このリンパ球浸潤の中心的役割を担っているのがT細胞とされ⁶⁾、炎症部位へのT細胞の血管外遊走には、走化因子であるケモカイン等が重要な役割を果たしている⁷⁾。当教室では、リンパ球浸潤に関与するケモカインであるCCL20^{8,9)}やCXCL10¹⁰⁾の発現が炎症歯髄で上昇し、歯髄炎の病態形成に関与していることを報告してきた。

一方、歯髄線維芽細胞は歯髄組織の大部分を占めており、歯髄の炎症応答において重要な働きをしている可能性があり、歯髄線維芽細胞から炎症性サイトカインであるinterleukin-8 (以下IL-8と略す)やvascular endothelial growth factor (以下VEGFと略す)などの成長因子が産生されることがすでに報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。しかしながら、細菌由来因子に対する歯髄線維芽細胞の動態については不明な点が多い。

ポリフェノールは自然界に広く存在し、近年、機能性食品として話題になっており、緑茶や紅茶、ウーロン茶、赤ワインなどに豊富に含まれている¹⁵⁾。ポリフェノールの中で、フラボン骨格を持つものをフラボノイドといい、緑茶特有のフラボノイドをカテキンという。緑茶カテキンには8種類のカテキン類があり、このうち主要なものが、エピガロカテキンガレート (以下EGCGと略す)、エピカテキンガレート (以下ECGと略す)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキン (EC) の4種類で、一般的にはこれらを総称してカテキンという。EGCGは、4種類のカテキンの中で緑茶に最も多く含まれており、抗酸化作用が強いと報告されている¹⁶⁾。カテキンの生理作用としては、抗酸化作用をはじめ、抗菌作用^{17,18)}、抗アレルギー作用、抗腫瘍作用^{19,20)}、抗炎症作用^{21,22)}を有することが知られている。線維芽細胞に対するカテキンの効果については、抗炎症作用や抗腫瘍作用を有する報告はあるが^{23,24)}、これらは皮膚や肺由来の線維芽細胞を用いて行われたものであり、歯髄組織由来細胞についてのカテキンの効果は報告されていない。

近年、臨床においては可能な限り生活歯髄を保存しようとする機運が高まっており、その重要性が論じら

れている。従来、齶蝕除去中に露髄した場合は、歯髄に炎症や細菌感染が生じている可能性が高いと判断され、抜髄処置の適応になると考えられてきた²⁵⁾。しかしながら、術前に臨床症状がない症例においては、齶蝕による露髄であっても直接覆髄により歯髄を保存できるとの報告²⁶⁻³⁰⁾があり、齶蝕除去中に露髄した場合の覆髄の適否については現在もお明確な基準はない。

歯髄炎の病態形成のメカニズムを明らかにし、それに基づく治療法が確立できれば可及的な歯髄の保存も可能となる。そこで、本研究では、歯髄保存療法的一端を担う新しい治療法の開発を目的として、歯髄炎の病態形成における歯髄線維芽細胞の動態を解明するとともに、歯髄炎病変部へのカテキン応用の可能性を探索した。すなわち、臨床的正常歯髄より分離した歯髄線維芽細胞を培養し、まず細菌由来因子でありかつToll-like receptor (以下TLRと略す)のリガンドであるlipopolysaccharide (以下LPSと略す)およびpeptidoglycan (以下PGNと略す)を培地に添加し、歯髄線維芽細胞によるサイトカインや成長因子および接着分子の遺伝子発現やタンパク産生の変動を解析した。さらに、それらの因子で刺激された歯髄線維芽細胞に対するEGCGおよびECGの影響を同様の指標で解析し比較することで、炎症歯髄に対する緑茶カテキンの効果について考察した。

材料と方法

1. 歯髄線維芽細胞の培養

ヒト歯髄線維芽細胞は、徳島大学病院歯科を受診し、基礎疾患を有しておらず、過去6ヶ月間に投薬処置を受けていない患者の歯髄から採取した。すなわち、齶蝕および歯周炎を有さない健全全歯、あるいは矯正目的のため便宜抜歯された健全小臼歯より歯髄を摘出し、細切した後、1 mM ビルビン酸ナトリウム (Gibco, Gland Island, NY, USA)、10 % fetal bovine serum (以下FBSと略す, JRH Biosciences, Lenexa, KA, USA)、50 IU/ml ペニシリン (Gibco)、50 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco)を添加したDulbecco's modified Eagle's medium (以下DMEMと略す, Gibco)にて37℃、5 % CO₂存在下で初代培養を行った。約3週間後に組織片より遊走した歯髄細胞を継代し、5~10代の細胞を実験に使用した。なお、実験に際しては徳島大学倫理審査委員会の承認のもと、被験患者に本研究の内容を説明し、同意を得た上で試料を採取した。

2. カテキンの調製

カテキンは、EGCGとECG (和光純薬、大阪)の2種類を使用した。蒸留水にて1 mg/mlに調製し、培地中の最終濃度が1, 2, 5, 10, 20, 50 µg/mlになるようにEGCGとECGを希釈し実験に供した。

3. Total RNA の抽出および Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (以下 RT-PCR と略す) 分析

1) total RNA の抽出

培養細胞からの total RNA の抽出は、添付プロトコールに従って NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel Ltd, Banbury, Oxfordshire, UK) を用いて行った。

2) Complementary DNA (cDNA) の合成および遺伝子増幅

抽出した total RNA は、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 (タカラバイオ, 滋賀) を用い、プロトコールに従って cDNA の合成を行った。その後、PCR Master Mix (ABgene House, Surrey, UK) を用い、プロトコールに従って遺伝子の増幅を行った。その際、表 1 に示す sense および antisense プライマーならびに TaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ) を用い、至適条件のもとで反応・増幅させた。得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動法により分離し、ゲルをエチジウムブロマイド (和光純薬) にて染色し、UV トランスイルミネーター (コスモバイオ, 東京) を用いて当該バンドを検出した。マーカーは Bench Top PhiX174 DNA/ Hae III Markers (Promega, Madison, USA) を使用した。

4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (以下 ELISA と略す)

培養歯髄線維芽細胞上清中の IL-8, IL-6 の定量には、市販の Duo Set ELISA Development System (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用い、さらに VEGF の定量には、ELISA Development Kit (PEPROTECH EC, Rocky Hill, NJ, USA) を用い、波長 450 nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定した。

5. フローサイトメトリー解析

歯髄線維芽細胞上における intercellular adhesion molecule-1 (以下 ICAM-1 と略す)、および vascular adhesion molecule-1 (以下 VCAM-1 と略す) の発現は、抗ヒト ICAM マウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich, Walkersville, MD, USA) および抗ヒト VCAM マウスモノクローナル抗体 (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) を用いたフローサイトメトリーにて検索した。すなわち、回収した細胞を 0.2% 牛血清アルブミン (Sigma-Aldrich) を含む、 Mg^{2+} , Ca^{2+} を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS(-) と略す, pH 7.0) にて攪拌し、各モノクローナル抗体を 5 μ g/ml に希釈し 4℃ で 30 分間反応させた。次いで、PBS(-) にて 3 回洗浄した後、二次抗体として Fluorescein isothiocyanate (以下 FITC と略す) で標識した抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を用いて 4℃ で 30 分間反応させた。PBS(-) にて 3 回洗浄した後、細胞自動解析装置 (EPICS XL-MCL; Beckman Coulter,

表 1 プライマーの塩基配列および PCR 条件

増幅遺伝子		塩基配列	アニーリング温度 (°C)	増幅産物 (bp)
GAPDH	sense	5'-TGAAGTTCGGAGTCAACGGATTGGT-3'	59	985
	antisense	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'		
TLR-2	sense	5'-GGCCAGCAAAATACCTGTGTG-3'	60	623
	antisense	5'-CCAGGTAGGTCTTGGTGTTC-3'		
TLR-4	sense	5'-CTGCAATGGATCAAGGACCA-3'	60	259
	antisense	5'-TCCCACTCCAGGTAAGTGT-3'		
IL-8	sense	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCGTGGCT-3'	60	294
	antisense	5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTC-3'		
VEGF	sense	5'-CTGCTGTCTTGGGTGCTAG-3'	60	214
	antisense	5'-TTGACATTGTGTGCTGTAG-3'		
ICAM-1	sense	5'-CGTGCCGCACTGAAGTGGAC-3'	60	447
	antisense	5'-CCTCAGCACTTCACTGTCACT-3'		
VCAM-1	sense	5'-ATTGGGAAAAACAGAAAGAG-3'	56	642
	antisense	5'-GGCAACATTGACATAAGT-3'		
IL-6	sense	5'-CCACTCACCTCTTCAGAA-3'	57	453
	antisense	5'-GCGCAGAAATGAGATGAGT-3'		
DSPP	sense	5'-GAGGATAAAGGACACATGG-3'	58	280
	antisense	5'-AAGAAGCATCTCCTCGGC-3'		

Fullerton, CA, USA) を用いて解析を行った。蛍光強度は、System II ソフトウェア (Beckman Coulter) を用いて Mean fluorescence intensity (MFI) として評価した。

6. 生細胞数の測定

生細胞数は Cell Proliferation Assay System テトラカラーワン (LIFE SCIENCE, 生化学工業, 東京) を用い、プロトコールに従って測定した。すなわち、96穴プレートに歯髄線維芽細胞を播種し、37℃, 5% CO₂ インキュベーターで 24 時間培養を行い、さらに、EGCG または ECG を含む培養液を添加し 24 時間培養した。その後、各ウェルにテトラカラーワン溶液を加えて 1 時間反応させた後、波長 450 nm での吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

7. 歯髄線維芽細胞における IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の発現解析

24穴プレートに歯髄線維芽細胞を $4 \sim 6 \times 10^4$ cells/well になるように播種し、ほぼコンフルエントに達するまで培養した後、0.1, 1, 10 μ g/ml の *E. coli* 由来 LPS (Sigma-Aldrich) あるいは *S. aureus* 由来 PGN (Sigma-Aldrich) を 24 時間作用させた。引き続き、培養上清中の IL-8 および VEGF を ELISA 法にて定量した。また回収した細胞における IL-8, VEGF, ICAM-1 および VCAM-1 の遺伝子の発現は、total RNA を抽出した後、RT-PCR 法にて分析し、細胞膜上の ICAM-1 および VCAM-1 の発現はフローサイトメトリーにより解析した。

8. カテキン処理した歯髄線維芽細胞における IL-8, IL-6, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の発現解析

歯髄線維芽細胞を 1, 2, 5, 10, 20, 50 μ g/ml の EGCG および ECG で 1 時間処理し、1 μ g/ml の LPS ならびに 10 μ g/ml の PGN にて 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-8, IL-6 および VEGF を ELISA 法にて定量した。また回収した細胞における IL-8, IL-6 の遺伝子

の発現は、total RNA を抽出した後、RT-PCR 法にて分析し、細胞膜上の ICAM-1 および VCAM-1 の発現はフローサイトメトリーにより解析した。さらに、細菌由来因子をあらかじめ作用させ、炎症状態にあると仮定した歯髄線維芽細胞に、後からカテキンを加えた時の影響を検討するため、LPS あるいは PGN を添加してから12または24時間後に EGCG および ECG で処理し、培養上清中の IL-8 を ELISA 法にて定量した。

9. カテキン処理した歯髄線維芽細胞における石灰化関連タンパクの検索

1) dentin sialoprotein (以下 DSP と略す) タンパクの同定

6 穴プレートに歯髄線維芽細胞を $4 \sim 6 \times 10^5$ cells/well になるように播種し、ほぼコンフルエントに達するまで培養した後、 $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS ならびに $10 \mu\text{g/ml}$ の PGN にて24時間作用させた。また、 $50 \mu\text{g/ml}$ の EGCG で1時間処理した後、 $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS ならびに $10 \mu\text{g/ml}$ の PGN にて24時間作用させた。その後、lysis buffer [$25 \mu\text{M}$ Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton-X, 0.1% SDS, 1% NP-40, 10% Glycerol, プロテアーゼインヒビター (Sigma-Aldrich), 200 mM PMSF (和光純薬)] にて細胞を溶解した。その後、ウエスタンブロットを行うために、全細胞溶解液をポリアクリルアミド電気泳動に展開して PVDF 膜に転写し、 5% スキムミルクでブロッキングした後、1 次抗体として200倍希釈した抗 DSP モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) で 4°C , 12時間反応させた。メンブレンを PBS で十分洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識されたヒツジ抗マウス IgG 抗体 (Sigma-Aldrich) と室温で1時間反応させた。PBS で洗浄後、ECL-plus kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を用いた化学発色法にて検出した。

2) dentin sialophosphoprotein (以下 DSPP と略す) 遺伝子発現の解析

24穴プレートに歯髄線維芽細胞を $4 \sim 6 \times 10^4$ cells/well になるように播種し、ほぼコンフルエントに達するまで培養した後、 $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS ならびに $10 \mu\text{g/ml}$ の PGN にて4時間作用させた。なお、カテキンの前処理効果を検討するため、 $50 \mu\text{g/ml}$ の EGCG で1時間処理した後、 $1 \mu\text{g/ml}$ の LPS ならびに $10 \mu\text{g/ml}$ の PGN にて4時間作用させた。回収した細胞における DSPP の遺伝子発現は、total RNA を抽出した後、RT-PCR 法にて分析した。

10. 統計分析

得られたデータは平均±標準偏差で表し、Student *t* 検定を用いて統計学的処理を実施し、 $p < 0.01$ にて有意差ありと判定した。

結 果

1. 細菌由来因子が歯髄線維芽細胞の IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 発現に及ぼす影響

実験に先立ち、歯髄線維芽細胞において病原微生物を認識する受容体である TLR の遺伝子が発現しているかどうかを検索した。培養歯髄線維芽細胞における TLR2 および TLR4 の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析した結果、TLR2 および TLR4 の遺伝子発現を認めた (図 1)。歯髄線維芽細胞に TLR2 および TLR4 の遺伝子発現が認められたため、次に、細菌由来因子であり TLR4 および TLR2 のリガンドでもある LPS および PGN を添加したときの歯髄線維芽細胞の動態を検索した。すなわち、IL-8, VEGF, ICAM-1 および VCAM-1 の遺伝子発現、IL-8 と VEGF のタンパク産生、さらに ICAM-1 と VCAM-1 の細胞膜上への発現を *in vitro* で検討した。

1) LPS と PGN が IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 遺伝子発現に及ぼす影響

細菌の構成成分あるいは TLR リガンドが、歯髄線維芽細胞の IL-8 や VEGF、さらに接着分子の ICAM-1 と VCAM-1 の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため、LPS または PGN 添加時の上記遺伝子発現を RT-PCR 法にて測定した。その結果、LPS, PGN 添加によって、IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現が濃度依存的に増加した (図 2 A, B)。

IL-8 は LPS および PGN 添加2時間後から遺伝子発現を認め、24時間までその発現が誘導された (図 2 C, D)。また、VEGF の発現は持続的で、ICAM-1 は LPS および PGN 添加2時間後から遺伝子発現を認め、4時間でピークとなり、その後減弱する傾向を認めた (図 2 C, D)。LPS と PGN による影響を比較すると、IL-8, VEGF, ICAM-1 はほぼ同様の発現誘導を認めたが、VCAM-1 は

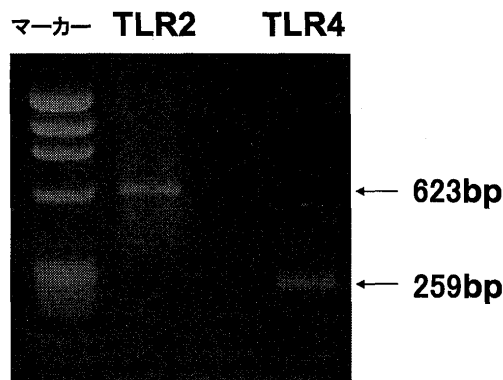


図 1 正常歯髄線維芽細胞における TLR2 および TLR4 の遺伝子発現

歯髄線維芽細胞から total RNA を抽出し、TLR2 および TLR4 の遺伝子発現を RT-PCR にて解析した。歯髄線維芽細胞において、TLR2 および TLR4 の遺伝子発現を認めた。

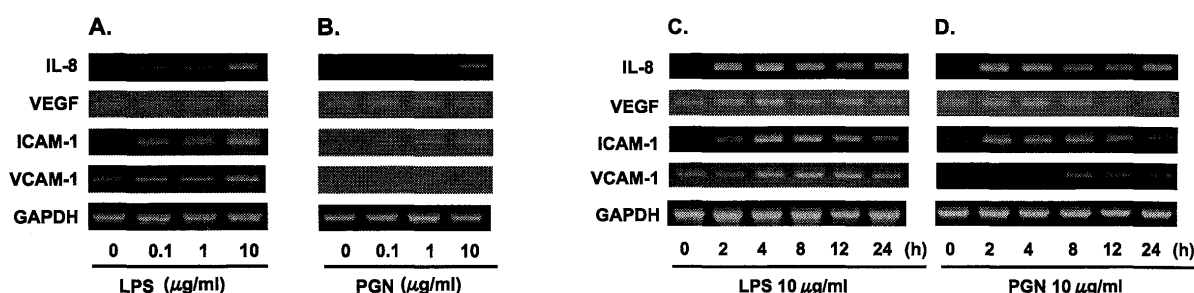


図2 LPS, PGN が歯髄線維芽細胞の IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 遺伝子発現に及ぼす影響

A: 歯髄線維芽細胞に0.1, 1, 10 µg/ml の LPS を24時間作用させた後, total RNA を抽出し, IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞に0.1, 1, 10 µg/ml の LPS を作用させると, IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現が濃度依存的に増加した。

B: 歯髄線維芽細胞に0.1, 1, 10 µg/ml の PGN を24時間作用させた後, total RNA を抽出し, IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞に0.1, 1, 10 µg/ml の PGN を作用させると, IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現が濃度依存的に増加した。

C: 歯髄線維芽細胞に10 µg/ml の LPS を 2~24時間作用させた後, total RNA を抽出し, IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞に10 µg/ml の LPS を作用させると, IL-8 は LPS 添加2時間後から遺伝子発現を認め, 24時間までその発現が誘導された。VEGF は持続的な発現誘導を認めた。ICAM-1 は LPS 添加2時間後から遺伝子発現を認め, 4時間から8時間でその発現がピークとなり, その後減弱する傾向を認めた。VCAM-1 は LPS 添加8時間後で発現がピークとなり, その後減弱する傾向を認めた。

D: 歯髄線維芽細胞に10 µg/ml の PGN を 2~24時間作用させた後, total RNA を抽出し, IL-8, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞に10 µg/ml の PGN を作用させると, IL-8 は PGN 添加2時間後から遺伝子発現を認め, 24時間までその発現が誘導された。VEGF は持続的な発現誘導を認め, PGN 添加2~4時間後でその発現が増強した。ICAM-1 は PGN 添加2時間後から遺伝子発現を認め, 4時間から8時間でその発現がピークとなり, その後減弱する傾向を認めた。VCAM-1 は8時間で発現がピークとなり, その後減弱する傾向を認めた。

LPS によって早期に発現が誘導され, その発現量も強く認められた (図2C, D)。

2) LPS と PGN が IL-8 および VEGF 産生に及ぼす影響

細菌由来因子の添加により歯髄線維芽細胞における IL-8, VEGF の遺伝子発現が認められたため, さらに, 培養上清中における IL-8 および VEGF のタンパクレベルでの解析を ELISA 法にて行った。その結果, LPS, PGN とともに濃度に依存して IL-8 および VEGF タンパク濃度の上昇が認められた (図3A, B)。

3) LPS と PGN が細胞膜上の接着分子発現に及ぼす影響

歯髄線維芽細胞において, ICAM-1 および VCAM-1 の遺伝子発現が認められたことより, さらに細胞膜上のそれらの発現に及ぼす LPS と PGN の影響についてフローサイトメトリーにて解析した。その結果, LPS, PGN 添加により ICAM-1, VCAM-1 の発現の増強が認められた (図4)。

2. 細胞増殖能へ及ぼすカテキンの影響

歯髄線維芽細胞に対するカテキンの毒性の有無を確認するため, カテキンが細胞増殖に与える影響を検討した。50 µg/ml の EGCG, ECG によって, わずかながら生細

胞数の減少がみられたものの, カテキンは細胞増殖能にほとんど影響を及ぼさなかった (図5)。なお, EGCG と ECG との作用には, 有意な差は認められなかった。

3. 細菌由来因子がカテキン処理した歯髄線維芽細胞の IL-8, IL-6, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 発現に及ぼす影響

細菌の構成成分である LPS, PGN 添加により, IL-8, VEGF 産生が増加し, ICAM-1, VCAM-1 の発現も増加することが明らかになった。そこで, 事前にカテキンで処理した歯髄線維芽細胞での LPS や PGN の炎症性サイトカインや接着分子の発現誘導に及ぼす効果を検討した。すなわち, LPS または PGN を作用させる前にカテキンで処理したときの歯髄線維芽細胞からの IL-8, IL-6, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 の発現がどのように変化するかを RT-PCR 法, ELISA 法およびフローサイトメトリーにて解析した。

1) LPS と PGN がカテキン処理した歯髄線維芽細胞の IL-8 および IL-6 に及ぼす影響

EGCG で前処理したとき, LPS と PGN による IL-8 および IL-6 遺伝子発現の減少は, EGCG 濃度が高い程

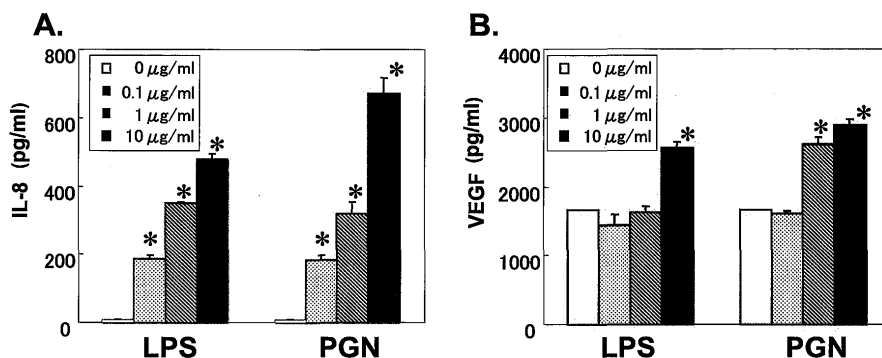


図3 LPS, PGNが歯髄線維芽細胞のIL-8およびVEGF産生に及ぼす影響

A：歯髄線維芽細胞にLPSおよびPGNを24時間作用させた後、培養上清を回収し、IL-8タンパクの産生をELISAによって測定した。歯髄線維芽細胞に0.1, 1, 10 μg/mlのLPSおよびPGNを作用させると、コントロールと比較して有意にIL-8タンパク濃度の上昇が認められた。

B：歯髄線維芽細胞にLPSおよびPGNを24時間作用させた後、培養上清を回収し、VEGFタンパクの産生をELISAによって測定した。歯髄線維芽細胞に10 μg/mlのLPSおよびPGNを作用させると、コントロールと比較して有意にVEGFタンパク濃度の上昇が認められた。

* $p < 0.01$ ；コントロールと比較して有意差を認めた。

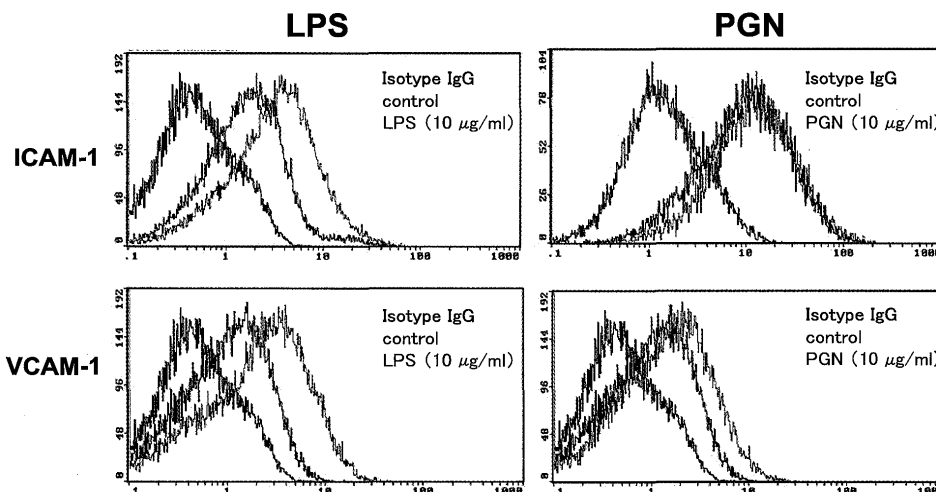


図4 LPS, PGNが歯髄線維芽細胞のICAM-1, VCAM-1発現に及ぼす影響

歯髄線維芽細胞に10 μg/mlのLPSおよびPGNを24時間作用させた後、細胞を回収し、歯髄線維芽細胞膜上のICAM-1およびVCAM-1発現をフローサイトメトリーにより解析した。LPSおよびPGN添加により、ICAM-1, VCAM-1発現の増加が認められた。

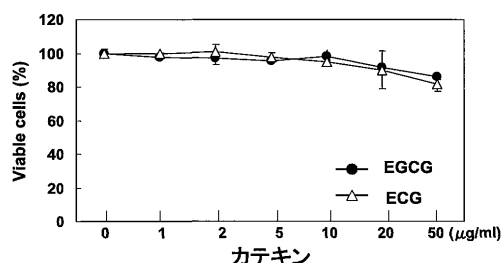


図5 カテキン処理における歯髄線維芽細胞のviability
カテキンで24時間処理した時の歯髄線維芽細胞に与える影響をテトラカラーワンにて検討した。EGCGおよびECGによる影響はほとんど認められなかった。

大きく、とくに高濃度のEGCG (20 μg/mlおよび50 μg/ml)において著明に認められた(図6A, 図7A)。ECG前処理においては、EGCG前処理したときと同様の傾向を認めたが、抑制効果はEGCG前処理に比べ弱かった(図6B, 図7B)。

2) LPSとPGNがカテキン処理した歯髄線維芽細胞のIL-8, IL-6, VEGF産生に及ぼす影響

LPS, PGNの添加によって上清中に産生されたIL-8, IL-6およびVEGFタンパク量は、EGCGやECGの濃度が高い程、有意に減少した(図6C, D, 図7C, D, 図8A, B)。とくに、IL-8, IL-6に関しては、EGCG, ECG濃度20 μg/mlと50 μg/mlの前処理において、著し

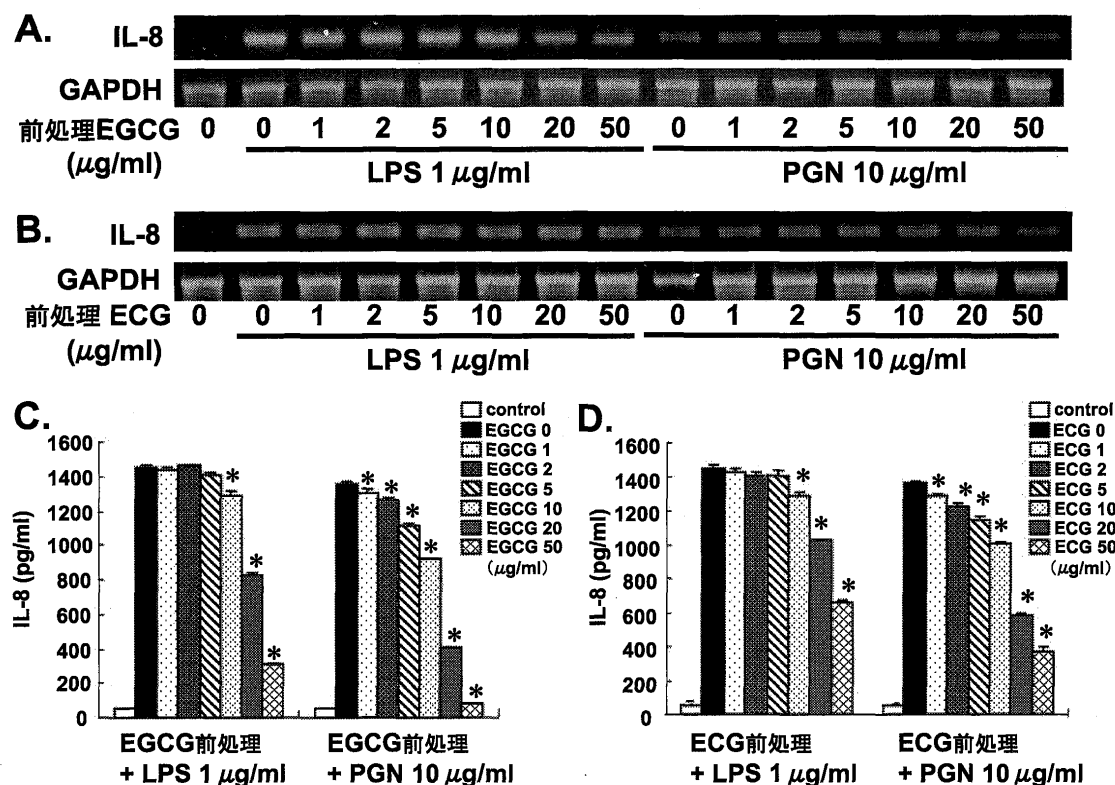


図6 歯髄線維芽細胞のIL-8発現に及ぼすカテキン前処理の影響

歯髄線維芽細胞をEGCG (A) または ECG (B) で1時間処理した後、LPS または PGN を4時間添加した。その後、total RNA を抽出し、IL-8 の遺伝子発現を RT-PCR によって解析した。歯髄線維芽細胞をEGCG で前処理したとき、LPS、PGN とともに高濃度のEGCG (20 μg/ml, 50 μg/ml) において、IL-8 遺伝子発現の減少を認めた (A)。ECG 前処理では、IL-8 遺伝子発現の抑制効果は少なかった (B)。歯髄線維芽細胞をEGCG (C) または ECG (D) で1時間前処理した後、LPS または PGN を24時間添加した。その後、培養上清を回収し、IL-8 タンパクの産生をELISA によって測定した。歯髄線維芽細胞をEGCG (C) または ECG (D) で処理したとき、LPS、PGN 添加によって、EGCG (C) や ECG (D) の濃度に依存してIL-8 タンパク産生の減少を認めた。

* $p < 0.01$; カテキン無処理と比較して有意差を認めた。

いIL-8、IL-6 産生の減少が認められた (図6 C, D, 図7 C, D)。VEGF タンパク産生は、EGCG、ECG 濃度10 μg/ml, 20 μg/ml, 50 μg/ml の前処理において、コントロールに比べ減少する傾向を示した (図8 A, B)。

3) LPS と PGN がカテキン処理した歯髄線維芽細胞膜上の接着分子発現に及ぼす影響

LPS または PGN 添加により発現増強した歯髄線維芽細胞膜上のICAM-1 およびVCAM-1 は、EGCG 前処理により、その発現が抑制された (図9 A, 図10A)。さらに、前処理したEGCG の濃度に依存してICAM-1 およびVCAM-1 の発現は減少した (図9 B, 図10B)。

また、ECG で前処理したときの歯髄線維芽細胞膜上のICAM-1 およびVCAM-1 の発現についてもEGCG 処理の時と同様の抑制傾向が認められた (データに示さず)。

4. 細菌由来因子による歯髄線維芽細胞のIL-8 産生に及ぼすカテキン後処理の影響

歯髄線維芽細胞において、LPS や PGN などの細菌由来因子を作用させることにより増加したIL-8 産生は、カテキンで前処理することにより、その産生が抑制された。しかし、実際の臨床場においてのカテキン応用を考えると、歯髄が炎症状態にある症例で適用する可能性が高いと思われる。そこで、細菌由来因子を先に作用させ、炎症状態にあると仮定した条件で、後からカテキンを加えるとどのような変化が生じるかを検討した。

すなわち、以下に示す条件において、培養上清中に産生されたIL-8 タンパク量をELISA 法にて定量した。陽性コントロール (条件1) として、0.1 μg/ml のLPS、PGN を48時間作用させた。カテキン後処理として、LPS、PGN を24時間 (条件2) あるいは12時間 (条件3) 作用させた後に、50 μg/ml EGCG または ECG で

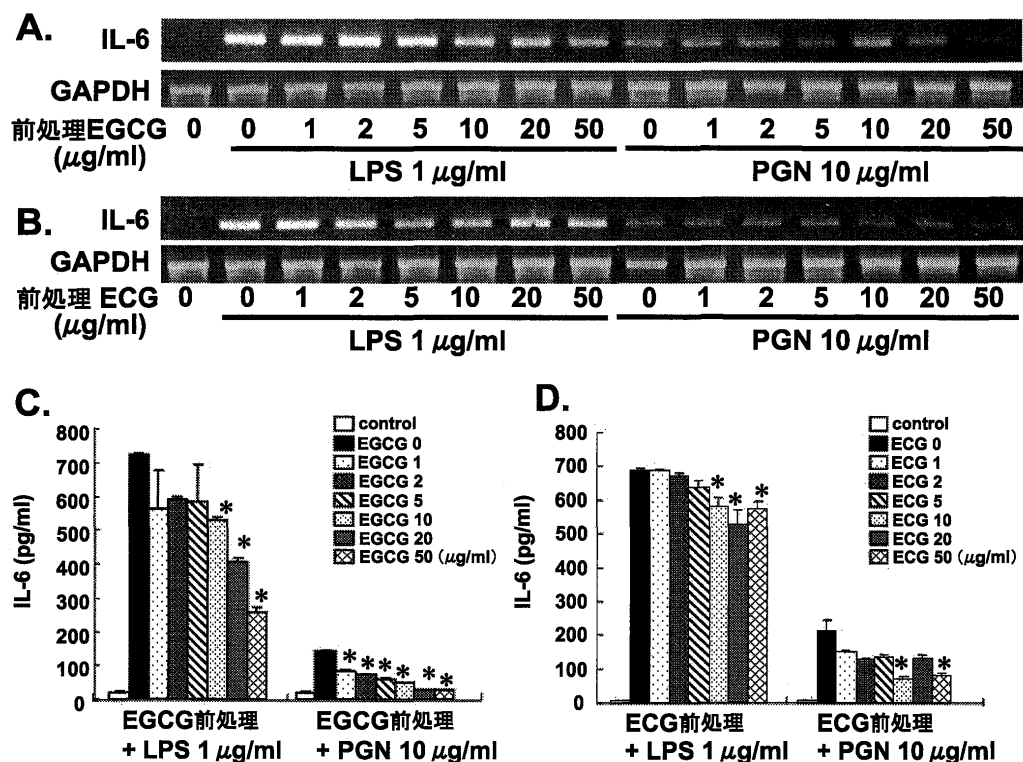


図7 歯髄線維芽細胞のIL-6発現に及ぼすカテキン前処理の影響

歯髄線維芽細胞をEGCG(A)またはECG(B)で1時間前処理した後、LPSまたはPGNを4時間添加した。その後、total RNAを抽出し、IL-6の遺伝子発現をRT-PCRによって解析した。歯髄線維芽細胞をEGCGで前処理したとき、LPS、PGNともに高濃度のEGCG(20 μg/ml, 50 μg/ml)において、IL-6遺伝子発現の減少を認めた(A)。ECG前処理では、IL-6遺伝子発現の抑制効果は少なかった(B)。

歯髄線維芽細胞をEGCG(C)またはECG(D)で1時間前処理した後、LPSまたはPGNを24時間添加した。その後、培養上清を回収し、IL-6タンパクの産生をELISAによって測定した。歯髄線維芽細胞をEGCG(C)またはECG(D)で処理したとき、LPS、PGN添加によって、EGCG(C)やECG(D)の濃度に依存してIL-6タンパク産生の減少を認めた。

* $p < 0.01$; カテキン無処理と比較して有意差を認めた。

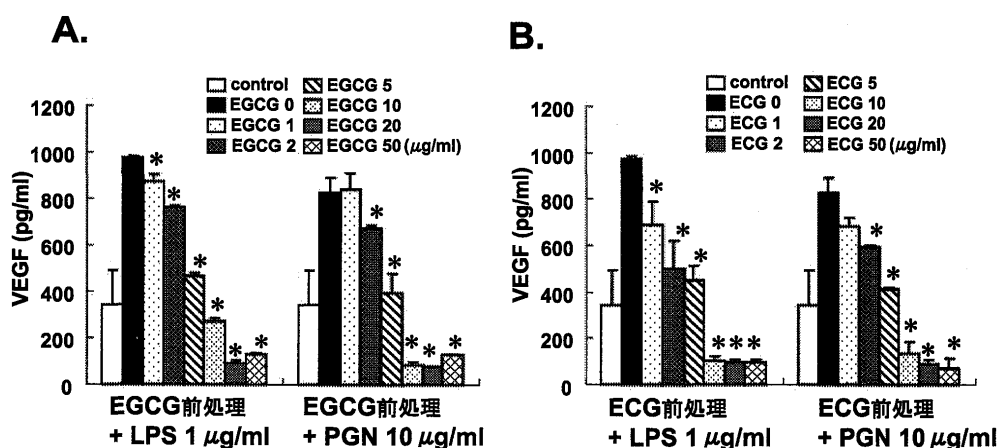


図8 歯髄線維芽細胞のVEGF産生に及ぼすカテキン前処理の影響

歯髄線維芽細胞をEGCG(A)またはECG(B)で1時間処理した後、LPSまたはPGNを24時間添加した。その後、培養上清を回収し、VEGFタンパクの産生をELISAによって測定した。歯髄線維芽細胞をEGCG(A)またはECG(B)で処理したとき、LPS、PGN添加によって、EGCG(A)やECG(B)の濃度に依存してVEGFタンパク産生の減少を認めた。

* $p < 0.01$; カテキン無処理と比較して有意差を認めた。

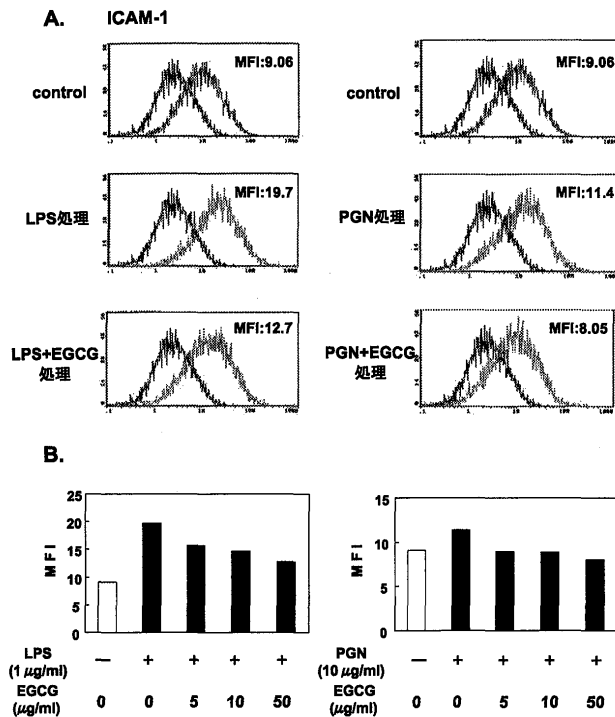


図9 歯髄線維芽細胞の ICAM-1 発現に及ぼす EGCG 前処理の影響

A: 歯髄線維芽細胞を 50 µg/ml の EGCG で 1 時間前処理した後, LPS または PGN を 24 時間作用させて細胞を回収し, 歯髄線維芽細胞膜上の ICAM-1 発現をフローサイトメトリーにより解析した。右上の数値は mean fluorescence intensity (MFI) を示す。LPS, PGN 添加により上昇した ICAM-1 の発現は, EGCG 処理により抑制された。

B: 歯髄線維芽細胞を 5, 10, 50 µg/ml の EGCG で 1 時間前処理した後, LPS または PGN を 24 時間作用させて細胞を回収し, 歯髄線維芽細胞膜上の ICAM-1 発現をフローサイトメトリーにより解析した。LPS, PGN 添加により上昇した ICAM-1 の発現誘導は EGCG 濃度に依存して抑制された。

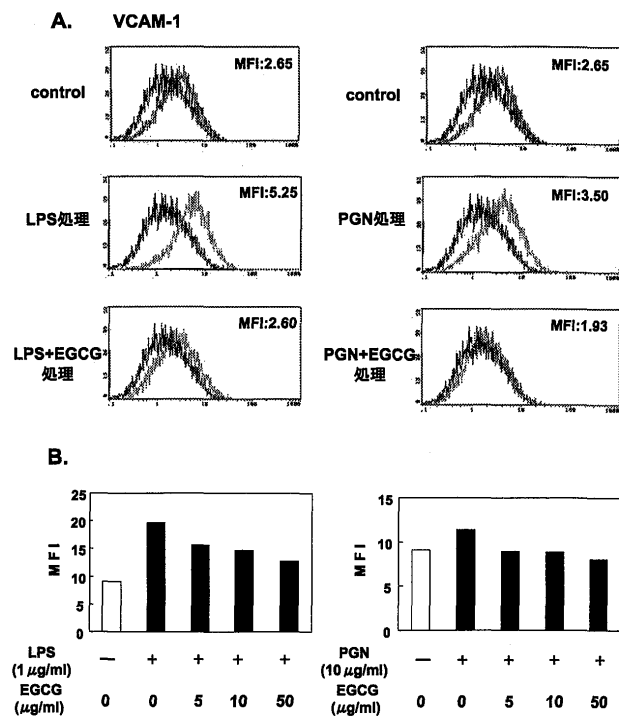


図10 歯髄線維芽細胞の VCAM-1 発現に及ぼす EGCG 前処理の影響

A: 歯髄線維芽細胞を 50 µg/ml の EGCG で 1 時間前処理した後, LPS または PGN を 24 時間作用させて細胞を回収し, 歯髄線維芽細胞膜上の VCAM-1 発現をフローサイトメトリーにより解析した。右上の数値は MFI を示す。LPS, PGN 添加により上昇した VCAM-1 の発現は, EGCG 処理により抑制された。

B: 歯髄線維芽細胞を 5, 10, 50 µg/ml の EGCG で 1 時間前処理した後, LPS または PGN を 24 時間作用させて細胞を回収し, 歯髄線維芽細胞膜上の VCAM-1 発現をフローサイトメトリーにより解析した。LPS, PGN 添加により上昇した VCAM-1 の発現誘導は EGCG 濃度に依存して抑制された。

後処理した。さらに, 同時処理として, LPS, PGN とカテキンを同時に加え, 48 時間培養を行った (条件 4)。

その結果, 図11に示すように, LPS または PGN で作用させた後にカテキンで処理した場合, カテキン前処理した場合と同様に歯髄線維芽細胞の IL-8 産生は減少した。また, カテキン処理時間に依存して, IL-8 産生は減少する傾向を認めた。EGCG 後処理と ECG 後処理による影響を比較すると, EGCG のほうが, IL-8 産生抑制効果は強かった。

5. 歯髄線維芽細胞における DSPP 遺伝子発現および DSP タンパク産生に及ぼすカテキンの影響

歯髄は外部侵襲に対して修復象牙質や被蓋硬組織形成

等の機能を持つ重要な組織であり, 歯髄組織は潜在的に硬組織形成能を有しているとされている。そこで, カテキン処理が歯髄の石灰化関連タンパクの産生にどのように影響を及ぼすかについて検討した。すなわち, 歯の形成に重要なマーカーである DSP およびこのタンパクをコードする遺伝子である DSPP が, カテキンで処理することにより歯髄線維芽細胞における発現に及ぼす影響について検索した。

DSPP の遺伝子発現は RT-PCR 法にて, DSP のタンパク発現はウェスタンブロット法にて解析したところ, 無処理時の歯髄線維芽細胞において DSPP の遺伝子発現と DSP タンパク産生を認め, LPS または PGN を作用させると, DSPP 遺伝子発現の増強および DSP タンパク産生

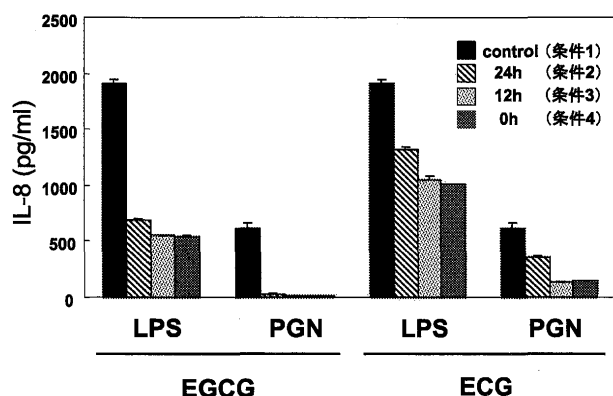


図11 歯髄線維芽細胞のIL-8産生に及ぼすカテキン後処理の影響

以下に示す各条件で細胞を処理し、その後回収した培養上清中のIL-8タンパクの産生をELISAによって測定した。コントロールとして0.1 $\mu\text{g/ml}$ のLPS, PGNを48時間作用させた(条件1)。カテキン後処理ではLPS, PGNを添加して24時間後(条件2)あるいは12時間後(条件3)に、50 $\mu\text{g/ml}$ EGCG, ECGを作用させた。さらに、LPS, PGNと同時にEGCG, ECGを加え、48時間培養を行った(条件4)。LPS, PGNを添加した後にEGCG, ECGで処理しても、IL-8タンパク産生はカテキン処理により減少した。

の増大を認めた(図12)。LPSおよびPGN添加の1時間前にEGCGを加えるとDSPPの遺伝子発現とDSPタンパク産生は抑制された(図12)。

考 察

齦蝕の進行により歯髄炎が発症すると、免疫細胞が活性化され、炎症部位へリンパ球の浸潤が認められるが³¹⁾、一般に、リンパ球の浸潤はケモカインや接着分子によって調節されていることが知られている^{32, 33)}。歯髄炎の原因として最も頻度が高いのは、齦蝕病巣に存在する細菌であり、樹状細胞やマクロファージといった免疫細胞がそれらを認識して免疫応答が惹起される。この時、免疫細胞は病原微生物を認識する多様な受容体を細胞表面に発現しており、その受容体を介してシグナルが伝達され、炎症性サイトカインなどが産生される。この受容体の中で代表的なものとして、TLR³⁴⁾が挙げられる。TLRは細菌やウイルスの構成成分を認識する一群の膜構成成分で、現在ヒトでは10種類存在する。細菌やウイルスなどの病原微生物が宿主の体内に侵入し、TLRが刺激されると炎症性サイトカインを産生して感染防御に働く。これらのうちTLR4はエンドトキシンであるLPSを、TLR2はTLR1やTLR6と2量体を形成して細菌由来リポペプチド、グラム陽性菌のPGNを認識している^{35, 36)}。

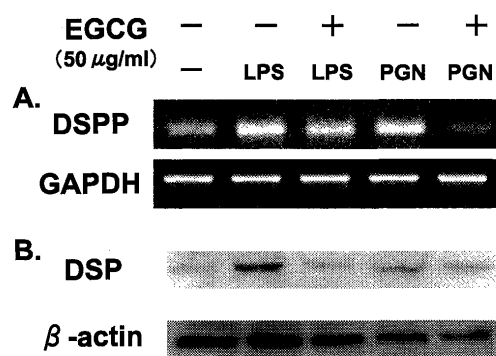


図12 歯髄線維芽細胞の石灰化関連タンパク発現に及ぼすカテキンの影響

A: 歯髄線維芽細胞に1 $\mu\text{g/ml}$ のLPSおよび10 $\mu\text{g/ml}$ のPGNを4時間作用させた。また、50 $\mu\text{g/ml}$ のEGCGで1時間前処理した後、1 $\mu\text{g/ml}$ のLPSおよび10 $\mu\text{g/ml}$ のPGNを4時間作用させた。その後、total RNAを抽出し、DSPPの遺伝子発現をRT-PCRによって解析した。LPS, PGN添加により、DSPP遺伝子発現の上昇を認め、EGCGで処理することでその発現は減少した。

B: 歯髄線維芽細胞に1 $\mu\text{g/ml}$ のLPSおよび10 $\mu\text{g/ml}$ のPGNを24時間作用させた。また、50 $\mu\text{g/ml}$ のEGCGで1時間前処理した後、1 $\mu\text{g/ml}$ のLPSおよび10 $\mu\text{g/ml}$ のPGNを24時間作用させた。その後、細胞を回収し、DSPタンパク発現はウエスタンブロットにて解析した。LPS, PGN添加により、DSPタンパク発現の上昇を認め、EGCGで処理することでその発現は減少した。

今回、ヒト歯髄組織における線維芽細胞のTLRの遺伝子発現について検討したところ、TLR2とTLR4の遺伝子発現を認めた。なお、歯髄組織の象牙芽細胞ではTLR2, TLR4に加えCD14の発現が報告されている³⁷⁻³⁹⁾。今回の実験では、TLR2のリガンドとして知られているPGNとTLR4のリガンドとして知られているLPSを用いて、歯髄組織の大部分を占める歯髄線維芽細胞に着目し、歯髄線維芽細胞における炎症性サイトカインや接着分子の発現を検討した。歯髄線維芽細胞をLPSまたはPGNで刺激すると、IL-8とVEGFの遺伝子発現とタンパク産生が認められ、さらに、歯髄線維芽細胞膜上のICAM-1とVCAM-1の発現を認めた。これらの各種因子の発現は、LPSやPGNの濃度に依存して増加した。接着分子であるICAM-1とVCAM-1は、IL-1やTNF- α で内皮細胞を活性化することによって発現し、炎症部位へのリンパ球浸潤に関与することはよく知られているが⁴⁰⁾、歯肉や歯根膜の線維芽細胞においてもICAM-1やVCAM-1の発現を認めており、IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 刺激によりそれらの発現が増強され、歯周炎の病態形成に関与していることが報告されている^{41, 42)}。今回LPSお

よび PGN 刺激によって歯髄線維芽細胞での ICAM-1 と VCAM-1 の発現増強が認められたことから、歯髄においても歯髄線維芽細胞が接着分子の発現を介して、炎症局所へのリンパ球集積に関与する可能性が示された。

近年、カテキンは抗酸化作用に加え、さらに抗炎症作用を有することが明らかとなってきた。緑茶ポリフェノールがヒト鼻腔線維芽細胞からの IL-8 産生を阻害すること⁴³⁾ やヒトケラチノサイトにおいて TNF- α で誘導された IL-8, VEGF 産生を阻害すること⁴⁴⁾ が報告されている。今回、歯髄におけるカテキンの効果を明らかにするために、細菌由来因子で刺激した歯髄線維芽細胞における炎症性サイトカインや成長因子、接着分子発現がカテキンで処理することによりどのような変化を受けるか検討した。その結果、EGCG および ECG 処理により、LPS あるいは PGN で刺激した歯髄線維芽細胞の IL-8, IL-6, VEGF タンパク産生は有意に減少し、さらに歯髄線維芽細胞上の ICAM-1 と VCAM-1 の発現も抑制された。また、このカテキンの抑制効果は濃度依存적であった。接着分子発現の抑制効果については、ICAM-1 と VCAM-1 ともに発現の減少を認めたが、VCAM-1 のほうが強く抑制された。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞においても、EGCG は IL-1 β で誘導された VCAM-1 の発現を阻害し、ICAM-1 や E-selectin にはほとんど影響を与えないとの報告がある⁴⁵⁾。このようにカテキンの抑制効果は ICAM-1 よりも VCAM-1 に強く認められるものと考えられる。なお、今回使用したカテキンは EGCG と ECG の 2 種類であったが、EGCG は主要なカテキン類の中で最も抗酸化作用が強力で、強い抗腫瘍作用のあることが知られている。この 2 種類のカテキンによる歯髄線維芽細胞への作用の違いを比較したところ、EGCG のほうにやや強い抑制効果が認められるものの、ほぼ同様の結果が示された。

これまでのカテキンに関する多くの研究では、20～100 mM の濃度が用いられてきた。しかし、我々が一度に数杯のお茶を摂取しても、EGCG の血中濃度は約 1 μ M 程度であるという報告がある³⁶⁾。今回使用したカテキンの濃度は 1～50 μ g/ml であり、高濃度のカテキン (20 あるいは 50 μ g/ml) で抑制効果が強く現れた。臨床応用を目指すには、歯髄に悪影響を及ぼさず、抗炎症作用を十分に発揮できる濃度の設定が必要になってくると思われる。

カテキンを臨床に应用することを考えると、すでに歯髄が炎症状態にある症例に使用する場合が想定される。そこで、あらかじめ炎症因子で刺激された培養歯髄細胞に対してカテキンが効力を発揮するかどうか検討した。その結果、細菌由来因子で刺激され、上昇していた歯髄線維芽細胞からの IL-8 産生は、カテキンの添加によって減少した。つまり、すでに炎症反応が認められる歯髄において、カテキンの使用は有効である可能性が示された。

歯髄組織の特異性として、アルカリフォスファターゼ活性が高く、潜在的に石灰化硬組織形成能を有しているとされている⁴⁷⁾。骨や歯に特有な非コラーゲン性タンパクとして、オステオカルシン、オステオポンチン、骨シアロタンパク、DSP などが知られているが、今回は歯の形成に重要なマーカーである DSP およびこのタンパクをコードする遺伝子である DSPP の検索を行った。EGCG で処理することにより、LPS あるいは PGN で誘導された DSPP 遺伝子発現および DSP タンパク発現は抑制された。生体のつくる抗菌物質として知られる β -defensin は、歯髄細胞において DSPP の遺伝子発現を増強し、象牙芽細胞への分化を誘導することが報告されている⁴⁸⁾。今回、カテキンと β -defensin とが異なる作用を示したことは興味深い。細胞増殖作用を有し、成長因子として知られている transforming growth factor- β (以下 TGF- β と略す) は、*in vitro* において象牙芽細胞の DSP 発現を抑制するとの報告がある⁴⁹⁾。しかし、*in vivo* の実験系では、TGF- β は象牙芽細胞の分化を誘導するとも報告されており⁵⁰⁾、TGF- β 単独では DSP 発現の抑制効果を示しても、他の様々な成長因子の総合的な作用によって、増殖や分化を促進している可能性がある。カテキンにおいても、*in vivo* の実験を行うことで、*in vitro* の結果とは異なる作用を示す可能性が考えられる。今後は、他の石灰化マーカーも探索し、カテキン処理による歯髄組織の石灰化関連タンパク産生への影響をより詳細に検討していく必要があるだろう。

カテキンのうち、とくに EGCG は I κ B のリン酸化を阻害することにより、NF- κ B の活性化を阻害することが知られている⁵¹⁾。歯髄線維芽細胞における IL-8 産生は転写調節因子である NF- κ B を介して行われているということは、シグナルインヒビターを用いた実験により確認済みである (データ示さず)。今回、カテキン処理により、IL-8 産生が濃度依存的に減少することが認められたが、その作用はカテキンが NF- κ B の活性化を阻害していることにより生じていると考えられる。緑茶カテキンの作用機序については、シグナルカスケードのリン酸化や転写因子の活性化を阻害するという報告があり、他の組織由来の線維芽細胞においては、MAP キナーゼや JNK, さらに NF- κ B を阻害するといわれている⁵²⁻⁵⁴⁾。例えば、ヒト皮膚由来線維芽細胞では、EGCG が p54 JNK/SAPK シグナル経路を阻害し⁵⁵⁾、またヒト胃ガン細胞においては、EGCG が AP-1 と NF- κ B の活性化を阻害することが報告されている¹⁹⁾。最近、新しい知見としてヒト肺ガン細胞において、67 kDa ラミニンレセプター (以下 67 LR と略す) が緑茶カテキン受容体として働く可能性があるとの報告がある^{46, 56, 57)}。すなわち、EGCG が細胞表面上の 67 LR と結合し、ガン細胞の増殖を抑制することが示されている。今後、歯髄組織において 67 LR が発現しているかどうか、さらに 67 LR 分子を介したカテキンの作用を明らかにすることで、歯髄に対

するカテキンの抗炎症作用の実態について新たな知見が得られる可能性がある。

実際の臨床におけるカテキンの使用方法については、カテキンの抗炎症作用および抗菌作用を期待して、露髄面における洗浄薬として使用する方法や覆髄剤の中の成分の一つとして使用する方法が考えられ、カテキンの使用濃度も含め、今後の大きな検討課題になるであろう。

本研究により、歯髄組織での TLR2 と TLR4 の発現が明らかとなり、TLR リガンドであり、さらに細菌由来因子である LPS や PGN が歯髄炎症病変局所で歯髄線維芽細胞を刺激し、炎症性サイトカインや接着分子の産生および発現を誘導することにより、歯髄炎の病態形成に関与していることが示唆された。さらに、緑茶カテキンがこれらの産生および発現を減少させることから、緑茶カテキンは歯髄の炎症を抑制する作用を持つ可能性が示された。

ま と め

歯髄保存療法的一端を担う新しい治療方法の開発を目的として、本研究では、細菌由来因子に対する歯髄線維芽細胞の動態の解明と歯髄病変部へのカテキン応用の可能性を探索した。すなわち、培養歯髄線維芽細胞を用い、細菌由来因子の LPS または PGN を作用させ、炎症性サイトカインや接着分子の発現を解析するとともに、さらにカテキンで処理した時のこれらの発現も検討し、以下の結果を得た。

1. 歯髄線維芽細胞において TLR2 と TLR4 の遺伝子発現が認められた。
2. 歯髄線維芽細胞に LPS および PGN を作用させると、IL-8, VEGF 産生量が増加し、歯髄線維芽細胞膜上の ICAM-1, VCAM-1 発現も増加した。
3. EGCG および ECG 前処理により、LPS および PGN を作用させた歯髄線維芽細胞の IL-8, IL-6, VEGF 産生量は有意に減少し、歯髄線維芽細胞膜上の ICAM-1, VCAM-1 発現も抑制された。
4. カテキン後処理でも前処理と同様に、LPS および PGN を作用させた歯髄線維芽細胞の IL-8 産生は減少した。
5. EGCG 処理により、LPS および PGN で誘導された DSPP 遺伝子発現および DSP タンパク発現は抑制された。

結 論

緑茶カテキンは炎症性サイトカインや成長因子および接着分子の発現を減少させることが明らかとなり、抗炎症作用を持つカテキンが歯髄炎に対して臨床応用できる可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御高閲を賜った歯

科保存学分野 松尾敬志教授に深甚なる謝辞を表しますとともに、御高閲、御助言を戴いた分子薬理学分野 吉本勝彦教授、歯周歯内治療学分野 永田俊彦教授に深謝いたします。また、直接御指導と御助言を戴いた歯科保存学分野 中西 正講師に厚く御礼申し上げます。最後に、数々の御教示と御助言を戴いた歯科保存学第一講座の諸先生方に深謝致します。

参考文献

- 1) 須田英明, 戸田忠夫: エンドドンティクス21, 永末書店, 2000, 87-89
- 2) 石橋真純: 歯内療法学; 第2版, 京都, 永末書店, 1992, 51-55
- 3) 福地芳則, 長田 保, 砂田今男: 歯内治療学; 第3版, 医歯薬出版, 1983, 105-124
- 4) Jontell M: Immune defence mechanisms of the dental pulp. Crit Rev Oral Biol Med, 179-200 (1998)
- 5) Izumi T, Kobayashi K, Okamura K and Sakai H: Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious teeth. Arch Oral Biol 40, 609-614 (1995)
- 6) Hahn CL, Falkler WA and Siegel MA: A study of T and B cells in pulpal pathosis. J Endod 15, 20-26 (1989)
- 7) Butcher EC and Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. Science 272, 60-66 (1996)
- 8) Nakanishi T, Takahashi K, Hosokawa Y, Adachi T, Nakae H and Matsuo T: Expression of macrophage inflammatory protein 3 α in human inflamed dental pulp tissue. J Endod 31, 84-87 (2005)
- 9) 高橋加奈子: 歯髄炎の病態形成における CCL20 の役割. 四国歯誌17, 193-210 (2004)
- 10) 足立智彦: 歯髄炎の病態形成における Interferon- γ inducible protein 10 (IP-10) の役割. 四国歯誌19, 1-15 (2006)
- 11) Engels-Deutsch M, Pini A, Yamashita Y, Shibata Y, Haikel Y, Scholler-Guinard M and Klein JP: Insertional inactivation of pac and rmlB genes reduces the release of tumor necrosis factor α , interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. Infect Immun 71, 5169-5177 (2003)
- 12) Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liu CM, Lai CC and Chang YC: Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented Bacteroides in human pulp fibroblasts and osteoblasts. Int Endod J 36, 774-779 (2003)
- 13) Chu SC, Tsai CH, Yang SF, Huang FM, Su YF, Hsieh YS and Chang YC: Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. J Endod 30, 704-707 (2004)

- 14) Tran-Hung L, Mathieu S and About I: Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res* 85, 819-823 (2006)
- 15) McKay DL and Blumberg JB: The role of tea in human health: an update. *Am Coll Nutr* 21, 1-13 (2002)
- 16) Dufresne CJ and Farnworth ER: A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* 12, 404-421 (2001)
- 17) Kusuda M, Inada K, Ogawa TO, Yoshida T, Shiota S, Tsuchiya T and Hatano T: Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1423-1431 (2006)
- 18) Hirasawa M, Takada K and Otake S: Inhibition of acid production in dental plaque bacteria by green tea catechins. *Caries Res* 40, 265-270 (2006)
- 19) Okabe S, Ochiai Y, Aida M, Park K, Kim SJ, Nomura T, Suganuma M and Fujiki H: Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect of components on human stomach cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 90, 733-739 (1999)
- 20) Sartippour MR, Shao ZM, Heber D, Beatty P, Zhang L, Liu C, Ellis L, Liu W, Go VL and Brooks MN: Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induction in human breast cancer cells. *J Nutr* 132, 2307-2311 (2002)
- 21) Ahmed S, Pakozdi A, Koch AE: Regulation of interleukin-1 β -induced chemokine production and matrix metalloproteinase 2 activation by epigallocatechin-3-gallate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 54, 2393-2401 (2006)
- 22) Wheeler DS, Catravas JD, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V and Wog HR: Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 β -dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J Nutr* 134, 1039-1044 (2004)
- 23) Chen PC, Wheeler DS, Malhotra V, Odoms K, Denenberg AG and Wong HR: A green tea-derived polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits I κ B kinase activation and IL-8 gene expression in respiratory epithelium. *Inflammation* 26, 233-241 (2002)
- 24) Basu-Modak S, Gordon MJ, Dobson LH, Spencer JP, Rice-Evans C and Tyrrell RM: Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 35, 910-921 (2003)
- 25) Tronstad L and Mjor IA: Capping of the inflamed pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 34, 477-485 (1972)
- 26) Lim KC and Kirk EEJ: Direct pulp capping: a review; *Endod Dent Traumatol* 3, 213-219 (1987)
- 27) Shovelton DS, Friend LA, Kirk EEJ and Rowa AHR: The efficacy of pulp capping material. *Br Dent J* 130, 385-391 (1971)
- 28) 今西和子, 松尾敬志, 中橋洋子, 鮫島義明, 恵比須繁之, 岡田 宏: 直接覆髄における術前および術中所見と術後成績の関係について. *日歯保存誌* 32, 1745-1750 (1989)
- 29) 中西 正, 高橋加奈子, 細川義隆, 尾崎和美, 松尾敬志: 歯髄炎の病態形成における細菌侵襲と歯髄反応. *四国歯誌* 14, 255-263 (2002)
- 30) Matsuo T, Nakanishi T, Simizu H and Ebisu S: A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. *J Endod* 22, 551-556 (1996)
- 31) Reeves R and Stanley HR: The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 22, 59-65 (1966)
- 32) Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaïss F, Heimchen UM and Stahl RA: Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/ macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 51, 211-223 (1997)
- 33) Sawa Y, Yoshida S, Shibata KI, Suzuki M and Mukaida A: Vascular endothelium of human dental pulp expresses diverse adhesion molecules for leukocyte emigration. *Tissue Cell* 30, 281-291 (1998)
- 34) Micheisen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ and Schumann RR: The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem* 276, 25680-25686 (2001)
- 35) 植松 智, 審良静男: Toll-like receptors と疾患. 炎症と免疫 12, 171-177 (2004)
- 36) Akira S, Takeda K and Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680 (2001)
- 37) Durand SH, Flascher V, Romeas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, Magloire H, Couble ML, Bleicher F, Staquet MJ, Lebecque S and Farges JC: Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol* 176, 2880-2887 (2006)
- 38) Jiang HW, Zhang W, Ren BP, Zeng JF and Ling JQ: Expression of toll like receptor 4 in normal human odontoblasts and dental pulp tissue. *J Endod* 32, 747-751 (2006)
- 39) Botero TM, Shelburne CE, Holland GR, Hanks CT and Nor JE: TLR4 mediates LPS-induced VEGF expression

- in odontoblasts. *J Endod* 32, 951-955 (2006)
- 40) Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G and Lobb R: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211 (1989)
 - 41) Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H and Matsuo T: Cytokines differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 144, 494-502 (2006)
 - 42) Joe BH, Borke JL, Keskinetepe M, Hanes PJ, Mailhot JM and Singh BB: Interleukin-1 β regulation of adhesion molecules on human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 72, 865-870 (2001)
 - 43) Kim IB, Kim DY, Lee SJ, Sun MJ, Li H, Cho JJ and Park CS: Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and A549 epithelial cells. *Biol Pharm Bull* 29, 1120-1125 (2006)
 - 44) Trompezinski S, Denis A, Schmitt D and Viac J: Comparative effects of polyphenols from green tea (EGCG) and soybean (genistein) on VEGF and IL-8 release from normal human keratinocytes stimulated with the proinflammatory cytokine TNF α . *Arch Dermatol Res* 295, 112-116 (2003)
 - 45) Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G and Stangl V: The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 659-665 (2004)
 - 46) 立花宏文, 岡 達三: 緑茶カテキンはラミニンレセプター (67LR) を介してガン細胞の増殖を抑制する. *ビタミン* 78, 513-514 (2004)
 - 47) Nakao K, Itoh M, Tomita Y, Tomooka Y and Tsuji T: FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1052-1059 (2004)
 - 48) Shiba H, Mouri Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Takeda K, Sugai M, Kinane DF and Kurihara H: Macrophage inflammatory protein-3 α and β -defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 867-871 (2003)
 - 49) Unterbrink A, O'Sullivan M, Chen S and MacDougall M: TGF β -1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts. *Connect Tissue Res* 43, 354-358 (2002)
 - 50) He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J and Smith AJ: TGF- β activated Smad signalling leads to a Smad3-mediated down-regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol* 49, 911-918 (2004)
 - 51) Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Tani T, Izumi R, Miwa K and Yamamoto K: Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF- κ B. *Transplant Proc* 34, 1335-1340 (2002)
 - 52) Vayalil PK and Katiyar SK: Treatment of epigallocatechin-3-gallate inhibits matrix metalloproteinases-2 and -9 via inhibition of activation of mitogen-activated protein kinases, c-jun and NF- κ B in human prostate carcinoma DU-145 cells. *Prostate* 59, 33-42 (2004)
 - 53) Sen P, Chakraborty PK, Raha S: Tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate impedes the anti-apoptotic effects of low-grade repetitive stress through inhibition of Akt and NF κ B survival pathways. *FEBS Lett* 580, 278-284 (2006)
 - 54) Fassina G, Vene R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM and Albini A: Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Cancer Res* 10, 4865-4873 (2004)
 - 55) Corps AN, Curry VA, Buttle DJ, Hazleman BL and Riley GP: Inhibition of interleukin-1 β -stimulated collagenase and stromelysin expression in human tendon fibroblasts by epigallocatechin gallate ester. *Matrix Biol* 23, 163-169 (2004)
 - 56) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y and Yamada K: A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol* 11, 380-381 (2004)
 - 57) Fujimura Y, Umeda D, Kiyohara Y, Sunada Y, Yamada K and Tachibana H: The involvement of the 67 kDa laminin receptor-mediated modulation of cytoskeleton in the degranulation inhibition induced by epigallocatechin-3-O-gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 524-531 (2006)